ヒト生体角膜内皮の細胞接合変化(図9)

大 原 國 俊 (自治医科大学眼科)

Changes of the Human Corneal Endothelial Cell Junction In Vivo

Kunitoshi Ohara

Department of Ophthalmology, Jichi Medical School

要 約

角膜移植 2 症例を対象に角膜内皮細胞スペキュラーマイクロスコピーを行い、パノラマ写真から同一内皮部分を同定する方法により、個々の内皮細胞について隣接細胞との細胞接合の経時変化を調べた。1 から 5 カ月間隔で得られた角膜内皮パノラマ写真から、再現性のある皺状陰影を指標に同一内皮部分を同定し、各時期の細胞像間で同一細胞と考えられる細胞を対比させた。正常 1 眼では11カ月で74細胞中 4 細胞、角膜移植 2 眼では各々 3 カ月で150細胞中12細胞と104細胞中34細胞に細胞の角数や隣接細胞との位置変化があった。隣接細胞との細胞接合組み替えによるものと考えられ、損傷修復過程中の細胞形態変化として検討すべき重要な知見と考えられた。(日眼 92:705-713、1988)

キーワード: ヒト生体角膜内皮細胞,スペキュラーマイクロスコピー,内皮パノラマ撮影,皺状陰影,同一細胞同定,細胞接合変化

Abstract

Changes of the cellular junction of the human corneal endothelial cells were studied by specular microscopy in 2 cases which underwent penetrating keratoplasty. Photomontages by Keeler-Konan specular microscope produced the reproducible wrinkling pattern at the central cornea which was used to relocate the same endothelial area in repeated observations of the same eye. A single cell was reidentified in successive photomicrographs by comparison of cell junction to neighbouring cells, a number of cell sides, cell shape, and cell size. The cell-by-cell analysis revealed changes of cellular junction to neighbouring cells, and the incidence of the changes was 4/74 cells within 11 months in a normal eye, and 12/150 cells and 34/104 cells within 3 months in 2 donor corneas, respectively. (Acta Soc Ophthalmol Jpn 92:705—713, 1988)

Key words: Human corneal endothelial cell, Specular microscopy, Wrinkling Pattern in photomontage, Relocation, Reidentification of the cell, Changes of cellular junction

I 緒 言

ヒト角膜内皮は生体内での細胞分裂能が低く, 内皮 損傷による細胞欠損部の損傷修復は主として隣接内皮 細胞の拡大と伸展や欠損部への移動などによって行わ れると考えられているが¹⁾,スペキュラーマイクロスコピー所見においては細胞面積の拡大や6角形細胞の出現頻度の変化以外には多くの報告を見ない。著者等は、細胞の形態を"大きさ"と"かたち"の特徴に分け、スペキュラーマイクロスコピーの画像から細胞形

別刷請求先:329-04 栃木県河内郡南河内町薬師寺3311-1 自治医科大学眼科学教室 大原 國俊 (昭和62年11月7日受付)

Reprint requests to: K. Ohara, M.D. Dept. of Ophthalmol., Jichi Medical School 3311-1 Yakushiji, Minamikawachi-machi, Kawachi-gun, Tochigi 329-04, Japan (Accepted November 7, 1987)

態を定量的に分析し、ヒト生体内皮細胞においても細胞の伸展と移動が生じていることを示唆する結果を報告した^{2)~4)}. 損傷修復機転においては、細胞面積の拡大や移動のみでなく、個々の細胞の隣接細胞との細胞接合にも変化が生じると考えられ、著者らは白内障術後眼に細胞モザイクの変化があることを報告したが^{5)~7)}, 角膜移植術後の2症例を対象に角膜内皮スベキュラーマイクロスコピーを行い、同一内皮部位を反復同定することにより個々の細胞の隣接細胞との接合変化を調べた結果を報告する.

II 対象と方法

対象は、角膜ヘルベスによる角膜混濁のために全層 角膜移植を受けた2症例である.症例1は、検査時25 歳の男性で、他院で左眼に全層角膜移植を受け、術後 1年5カ月目に検査を行った.矯正視力は右1.0,左1.2 で、移植片は透明であり、術後の拒絶反応の既往はない.右眼は正常.症例2は37歳男性で、左眼の全層角膜移植術後2年10カ月目に検査を行った。矯正視力は右1.0,左1.2で、術後2回の拒絶反応の既往があったが、いずれもステロイドの点眼と結膜下注射により透明治癒している。移植片中央やや下方裏面には色素沈着を伴った大型の角膜裏面沈着物があり、観察期間中その位置は不変であった。右眼は正常。

広視野スペキュラーマイクロスコープ(甲南カメラ 研究所, S-III) を用い, 1ないし3ヵ月の間隔で角膜 内皮パノラマ撮影を繰り返した。 角膜中央部の内皮パ ノラマ像上の皺状陰影 (Central posterior corneal wrinkle と呼称,以下 CPCW と略)を指標として同一 内皮部分を同定する方法により、各撮影時点で同一内 皮を選んだ5)~8)。同一部位として得られた400倍の拡大 写真から細胞輪郭をトレースし, 初回の内皮写真中か ら細胞面積が大きく多形性を示すものをマーカーとし て選び, 次回撮影の内皮写真で, CPCW との位置関係 とかたちの特徴,及び,角数が一致するものをそのマー カー細胞に対応する同一細胞として対応させた。他の 細胞については、マーカー細胞に隣接する細胞につい てマーカー細胞との隣接位置とかたちの特徴, 及び. 角数を初回と次回の拡大内皮像で対比し、一致するも のを同一細胞として対応させ, 次にその細胞の隣接細 胞について同様の対比操作を繰り返し、個々の細胞を 対比させる方法をとった. 隣接位置や角数が一致しな いものについては同一細胞としての対応を保留し,他

のマーカー細胞の隣接細胞から保留部分まで対比操作を繰返した。対象部位の平均細胞面積はディジタイザーにより200個の細胞について測定した。

III 結 果

図1に症例2の角膜移植眼の内皮パノラマ像を示す。図上方には移植片断端と縫合部が瘢痕として認められ、母角膜の血管侵入部分があり、角膜中央約8mmの内皮部分が撮影されている。移植片中央には不規則な走行を示すCPCWが認められる。図2と3は、3カ月間隔で撮影された症例2の健常右眼角膜中央部の内皮像である。両図の左側と下側にCPCWがあり、図3左側のCPCWが不明瞭であるがそのパターンは同一であり再現性が認められた。図2の矢印で示した陰影はマーカー細胞とした大型の細胞で下方の矢印のマーカー細胞には輪状の黒い陰影がある。図3の矢印は図2の各マーカー細胞に対応させた大型細胞であり、下

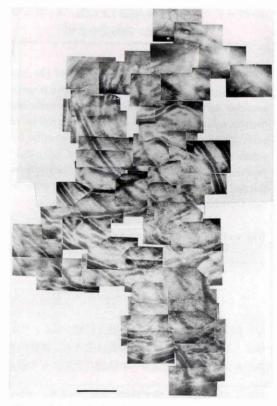


図1 症例2の角膜移植眼の角膜内皮パノラマ像.右上方に母角膜の血管侵入と移植片縫合部,右下方に縫合部を示す.中央部に不規則な皺状陰影がある.スケールは1mm.

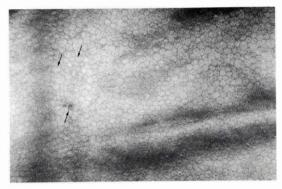


図2 症例2の正常右眼中央の角膜内皮像、左側と下 方の皺状陰影を示す。矢印は細胞同定のためのマー カー細胞で下方のマーカー細胞には輪状の暗い陰影 がある。

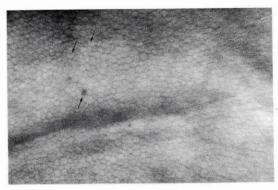


図3 図2と同一部分として得られた症例2の正常右 眼中央3カ月後の角膜内皮像。左側と下方に皺状陰 影がある。矢印は図2に示したマーカー細胞に対応 する細胞。

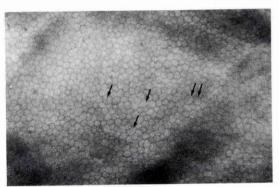


図 4a

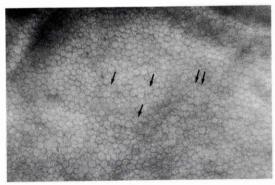


図 4b

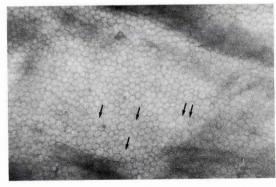


図 4c

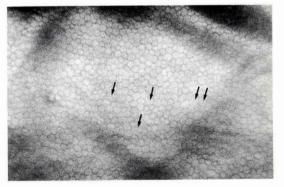


図 4d

図 4a, b, c, d 症例 1 の角膜移植眼中央から同一部分として得られた内皮細胞像. a から b まで各々 1 カ月間隔で,中央を矩形として囲む皺状陰影が再現されている。 矢印は a のマーカー細胞に対応する細胞.

方の矢印は輪状陰影を持つマーカー細胞である。図 4 は症例 1 左眼の角膜移植眼中央部から CPCW を指標として同一内皮部分として同定されたもので、a, b,

c, dは各1ヵ月間隔で撮影されている。各図には、中央を矩形として囲む CPCW があり、そのパターンは同一である。矢印は図4aでマーカー細胞として選ん

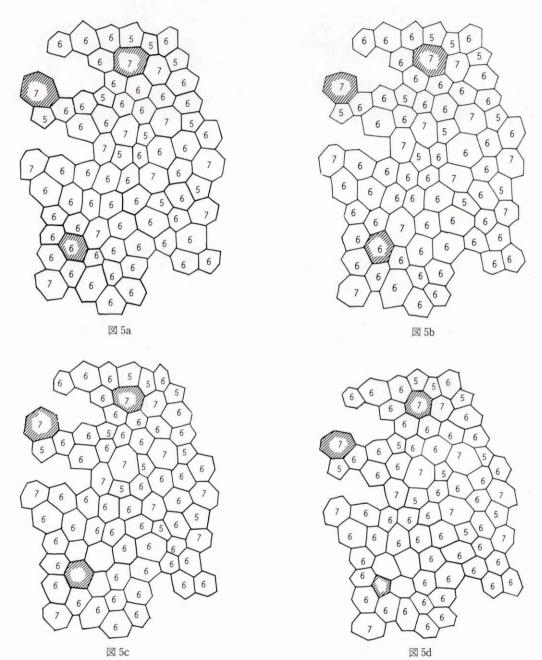


図 5a, b, c, d 図 2 と 3 に示した症例 2 正常右眼の同一角膜内皮部分からトレースした内皮細胞モザイク. b は a の 5 カ月後, c と d は各 3 カ月後で, c, d が図 2 と 3 に対応する. 斜線の細胞はマーカー細胞. 数字は角数を表し, 次回内皮像で同一細胞の対応が可能なもの, c, d の空白細胞は角数と隣接細胞の変化のため同一細胞の対応を保留したもの.

だ大型の細胞であり、CPCW との位置関係はよく一致し、各撮影時期で同一細胞として対応させることができた。

以上の結果から、移植片中央部の CPCW にも再現性があると考えられたため、各撮影時期の400倍拡大写真から個々の細胞について隣接細胞との接合関係を調べた。図 5a, b, c, d に図 2 と 3 で示した症例 2 の健常右眼の内皮部分につきトレースした内皮細胞輸郭を示す。a と b は 5 カ月間隔,他は 3 カ月間隔で, c, d が図 2 と 3 に対応する。斜線で囲んだ大型細胞は図 2 と 3 の矢印で示したマーカー細胞に対応するもので, a, b でも同一細胞として対応づけができた。各時期で同

一細胞として対応できたものを細胞の角数で示し,角 数と隣接細胞の不一致のため同一細胞としての同定を

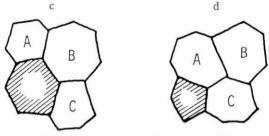


図 6 図 5c, d の保留細胞. 斜線はマーカー細胞. c の A, B, C は d の A, B, C に対応する.

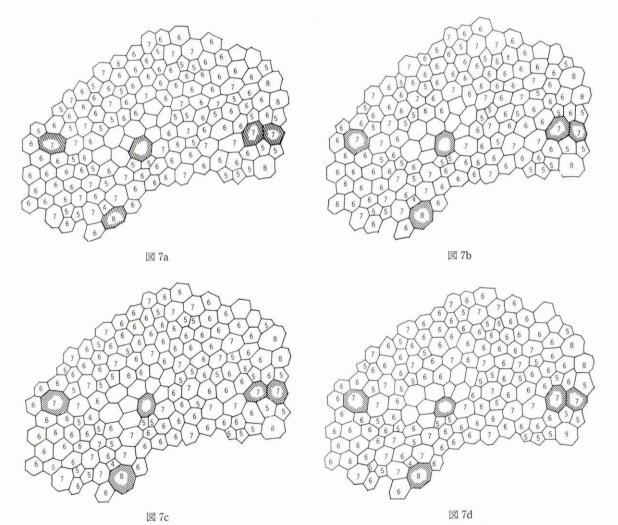


図7 図4a, b, c, d に示した症例1の角膜移植眼内皮細胞モザイク. 斜線の細胞はマーカー細胞. 数字は角数を表し、全時期で同一細胞の対応可能なもの、空白細胞は角数と隣接細胞の変化のため同一細胞の対応を保留したもの.

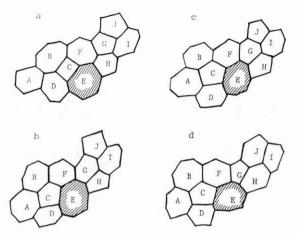
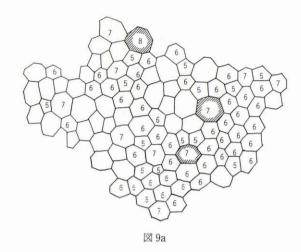


図8 図7の10個の保留細胞. 斜線はマーカー細胞. aのAからJはb, c, dのAからJに対応し, A ~D, E~H, G~Jの4細胞集団で接合の組み替えが 生じたと考えられる.

保留したものは空白で示した。a,bとb,c間では細胞 総数74個中で全ての細胞を対応づけることができた が、c. d間では輪状陰影をもつマーカー細胞を含めて 4個の細胞で角数と隣接細胞との配列が一致せず、同 一細胞としての対応を保留した。図6に図5c, dの保 留4細胞を英字大文字をつけその配列を示す。cでは マーカー細胞は6角形で、6角形のA細胞と7角形の B細胞及び6角形のC細胞と接している。A. B. C細 胞はその外接する細胞群との隣接関係から、dのA. B, C として規定される. このため, d ではマーカー細 胞は5角形となり、7角形のA細胞と7角形のC細胞 とのみ接し、6角形となったB細胞とは接合部分はな い. 従って, マーカー細胞と B 細胞との接合が解離し, A, C 細胞が新たに接合したと解釈すれば、保留 4 細胞 でも各細胞について同一細胞の対応が成立すると考え られた。11ヵ月の間に隣接細胞との接合変化を示した ものは74細胞中4細胞のみであり、細胞100個あたり1 カ月単位のみかけの変化率(%/月、モザイク変化率と 呼称)は0.49であった。同部の初回撮影時の細胞面積 $(\mu m^2, mean \pm S.D.)$ は365±75であった。

図7a, b, c, dに図4a, b, c, dで示した症例1の 左眼角膜移植眼の内皮細胞トレースを示す. 斜線で囲んだ細胞は図4a, b, c, dのマーカー細胞である. 全期間を通じて同一細胞が対比できたものを細胞の角数で示し、対応を保留されたものは空白で示した. 保留細胞は12個あり、対象細胞群の境界に位置する2個を



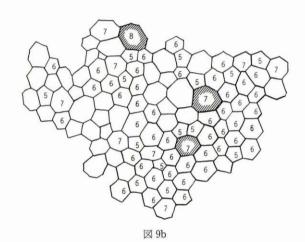


図 9a, b 症例 2 の角膜移植眼の同一内皮部分から 3 カ月間隔で得られた内皮細胞モザイク. 斜線の細胞はマーカー細胞. 数字は角数を表し, 全時期で同一細胞の対応可能なもの,空白細胞は角数と隣接細胞の変化のため同一細胞の対応を保留したもの.

除き,他の10細胞は1群の細胞集団として認められた.図8に10個の保留細胞を示す。AからD, EからH, GからJの各々4細胞集団で図6と同様に細胞接合組み替えが生じたと解釈すれば同一細胞の対応が可能であった。総細胞数150個につき3カ月間のモザイク変化率は2.66で初回撮影時の同部での平均細胞面積は390±108であった。

同様の方法で行った症例2の左眼移植眼の結果を図9a,bに示す.斜線と細胞の角数は各々マーカー細胞と全期間で同一細胞が対応できたもので,空白は保留細胞である.総細胞数104個中で保留細胞は34個あり,モ

ザイク変化率は10.89であった。初回撮影時の同部での 平均細胞面積は1292±441であった。多数の保留細胞が あるため詳細な検討は不能であるが、総細胞数は不変 であり、図6と同様の細胞接合の変化によるモザイク 変化と考えられた。なお、症例1の健常右眼にも CPCWの再現性があったが、細胞の大きさにバラツキ が少なく、マーカー細胞として利用できる大型の細胞 がないために同一細胞の同定は行わなかった。

IV 考 按

角膜内皮スペキュラーマイクロスコピーでは,同一 眼を対象として反復して内皮撮影を行う場合に,同一 内皮細胞を観察視野内で特定することができない。 こ のため、生体ヒト角膜の特定の単一細胞についてその 形態の経時変化を解明することは極めて困難であっ た 著者らは、無水晶体眼の角膜中央部にできる不規 則な走行を示す CPCW に再現性があることを認め, このパターンを指標とすれば、角膜中央部で同一角膜 内皮部分を反復して同定することができ,特定の内皮 細胞形態の経時変化をみることができることを報告し た5)~8)。今回対象とした被角膜移植眼の角膜内皮スペ キュラーマイクロスコピーでの対象は同種移植片であ り、移植片の CPCW の再現性は不明であったが、移植 片にも CPCW の出現と再現性があった。 CPCW を指 標に同一部分として選んだ内皮細胞写真につき, 撮影 全期間を通じて同一細胞として対応するマーカー細胞 が同定できたことからも,その再現性は明らかである. CPCW の成因は不明であるが、再現性があると報告さ れた角膜周辺部の同心円状の皺状陰影 (Posterior corneal ring, PCR)と同様のものと考えられ⁹⁾¹⁰⁾, パノラ マ像上で同一内皮部分を同定するための有用な指標と なる.

隣接細胞との接合関係の経時変化を検討するには、各内皮細胞写真について、同一細胞を同定する作業が必要となる。6角形を主とする多角形として配列する内皮細胞には個々の細胞を特徴づけるものが少なく、断続的な連続写真から個々の細胞を同定することは困難である。しかしながら、類似した大きさの細胞群のなかに少数の7、8、9角形の大型細胞が散在する場合には、それらの細胞を各時期の内皮写真から特定することは容易となる。本報では第1回目の撮影で選定したそれらの細胞を細胞同定のためのマーカー細胞として用いた。第2回目以後の内皮写真中のマーカー細胞同定は、CPCWとの位置関係から行い、全てのマー

カー細胞を対応づけることができた。その他の細胞の同定は、マーカー細胞を基準に、それに隣接する細胞についてマーカー細胞との隣接関係や大きさと形の特徴について対比し、一致するものを同一細胞として対応させ、同様の対比を全細胞について行った。

細胞の大きさは経時的に変化するものであり111121,同一細胞を対応づける指標として絶対的なものではなく,今回の結果においても同一として対応させた細胞に大きさの変化が生じているものがあった。このため、マーカー細胞には面積の変化があっても相対的な変化が小さく同一細胞として対応させやすい大型の細胞を選んだ。細胞の角数においても経時的に変動することが不特定多数の細胞群を対象にした検討で明らかにされている130.細胞の位置については、細胞の移動を生じる局所的な内皮損傷がない症例では変化量は極めて少ないと考えられた。

症例2正常眼のマーカー細胞については、11カ月の 観察期間中, いずれの時期でも輪状陰影を持つマー カー細胞以外は大きさとかたちの特徴が同一で, CPCW との位置関係も不変であり、同一細胞を同定し たものと考えられる。他の細胞についても、隣接細胞 との接合関係や大きさと形の特徴が一致することや, 保留4細胞を含めた対象総細胞数が不変であったこと から、対応する同一細胞を同定したと考えて矛盾しな い、保留細胞については、4細胞集団が外接する細胞 が同一で、細胞集団がなす多角形外周の角数が15で一 定であり、外周上に位置する隣接細胞との接合の起点 が同一であった。内皮細胞頂点に3辺が集合する通常 の多角形細胞配列を維持する条件下では、細胞集合体 を4分割する配列は図6に示した2配列の組合せ以外 にない。従って、保留4細胞の配列は結果に示したご とく細胞接合の変化によるものと解釈される。症例1 の移植片内皮の対象細胞群では境界の2細胞を除く保 留細胞は10個の細胞集団として認められたが、重複す る2細胞を含んだ4細胞集団単位で細胞接合の変化が 生じたと解釈することができた。症例2の角膜移植片 の104細胞中34細胞の保留細胞についても、総細胞数は 一定であり、保留細胞群の周辺では4細胞集団として 同様の接合組み替えで同一細胞を対応させることがで きる. 4細胞集団単位で細胞接合組み替えが生じる可 能性は、著者等が他に報告した生体ヒト無水晶体眼に も認められており5)~7)、培養ヒト角膜内皮でその可能 性が示唆され14)、ネコ角膜内皮創傷治癒過程やメダカ の形態発生中の卵黄嚢で生じることが証明され15)16),

同様の細胞接合変化がウサギ角膜内皮創傷治癒過程にもあったと報告されている¹⁷⁾.したがって,本報で報告した細胞接合の組み替えは,他の動物細胞の細胞接合の組み替え様式とよく一致し,細胞分裂のない単層細胞配列において隣接細胞間で接合を変える共通様式として生体ヒト角膜内皮で生じていることを実証するものと考えられる.

モザイク変化率は、細胞接合の変化量を定量的指数 として比較するために速度として計算した. みかけの 変化率とした理由は、全観察期間中で初回と最終の対 比から保留細胞とされた数値を基準としたため、観察 期間中に同一細胞で重複して生じるモザイク変化が含 まれていないこと,及び,期間内に4細胞集団内でモ ザイク変化を繰り返した場合には、みかけ上で変化な しとされる可能性があるためである。 モザイク変化率 は対照とすべき症例1の健常眼で0.49、症例1の移植 眼で2.66, 症例 2 移植片で10.89であり, 平均細胞面積 (μm^2) は各々365,390,1292であり、モザイク変化率 と細胞損傷の大きさとで相関を示す傾向が示唆され た. 損傷修復過程の角膜内皮細胞は形態を変え、熱力 学的にも安定な正6角形配列に修復させる細胞形態変 化のダイナミクスを持つと考えられるので15)18)、細胞 接合の組み替えはその方向性を示唆する現象として重 要な知見と考えられる.

スペキュラーマイクロスコピーによってヒト生体内 角膜内皮細胞の経時的な形態変化が明らかとなってき たが、不特定細胞を対象とした定量的方法ではそのパ ラメーター変化の基盤である特定個々の細胞形態変化 を知ることができない. 本報で試みた単一の特定細胞 の経時的形態変化を対象とする手法は、 臨床データの 意義を細胞レベルで検討するための一方法であり,同 時に,生物科学の観点から,細胞生物学的な解析方法 によってヒト生体内皮細胞を対象として, その動態を 解明する有力な方法となりうる。断続的な連続写真か ら同一細胞を同定する方法には絶対的な方法はなく, 同定する方法と結果の妥当性が要求される。本報で用 いた方法は、連続写真から同一物体を認知するために 最も基本的な位置と大きさ,及びかたちを指標として 同一細胞を対比させた。細胞接合の組み替えとして解 釈される細胞モザイク変化は多角形内皮細胞の形態変 化の一つとして角数変化が生じるとする従来の報告と 矛盾せず、細胞が隣接細胞との接合の組み替えを起こ すことを実証するものと考えられた。細胞接合組み替 えの意義については、更に症例を重ね、今後、明らか

にしたい

本論文の一部は第3回角膜移植学会work shop で発表 した。清水昊幸教授の御校閲に深謝します。

文 献

- Mishima S: Clinical investigation on the corneal endothelium. Am J Ophthalmol 93: 1—29, 1982.
- 2) 伊野田繁, 大久保彰, 龍井哲夫他:新しいバラメーターを用いたヒト角膜内皮細胞の定量的形態計測. 眼紀 34:1002-1009, 1983.
- 3) 大久保彰, 伊野田繁, 大原國俊:前眼部炎症と角膜内皮(1):角膜内皮パノラマ撮影と細胞形状の定量的解析。日眼 87:1233-1241,1983.
- 4) 大原國俊,伊野田繁,大久保彰: "かたち"を表わ すパラメーターを用いた白内障術後角膜内皮形態 の研究。日眼 88:662-667, 1984.
- 5) 大原國俊, 龍井哲夫, 大久保彰: 広視野スペキュラーマイクロスコープによる角膜内皮パノラマ像とその特徴. 臨眼 36:1332—1333,1982.
- 6) 大原國俊, 龍井哲夫, 大久保彰: ヒト角膜内皮パノ ラマ像と同一部位の反復撮影について. 眼紀 33: 2341-2347, 1982.
- 7) 大原國俊, 龍井哲夫, 大久保彰: 角膜のスペキュラーマイクロスコピー. 臨眼 37:291-297,1983.
- 8) 大原 國俊, 釣巻 穣: Nd: YAG レーザー後発 白内障切開術の角膜内皮への影響。日眼 89: 498 -502, 1985.
- Sherrard ES, Buckley RJ: Endothelial wrinkling—A complication of clinical specular microscopy. Proc 6th Cong Europ Soc Ophthalmol: 69—74, 1981.
- 10) Sherrard ES, Buckley RJ: Relocation of specific endothelial features with the clinical specular microscope. Brit J Ophthalmol 65: 820 -827, 1981.
- 11) 大原**國俊,伊野田繁,赤星隆幸**: Nd-YAG レーザーと specular microscope を用いた生体内角膜内皮損傷修復過程研究の実験モデル. あたらしい眼科 1:394-397,1984.
- 12) 大原國俊, 水流忠彦, 伊野田繁: 角膜内皮細胞形態 のパラメーター. 日眼 91: 1073—1078, 1987.
- 13) 松田 司,塩崎陽一,須田秩史他:ヒト角膜内皮細胞の創傷治癒過程一細胞の形,配列の変化についてー. 日眼 86:1944—1951,1982.
- 14) Sperling S: Early morphological changes in organ cultured human corneal endothelium. Acta Ophthalmol 56: 785—792, 1978.
- 15) Honda H, Ogita Y, Higuchi S, et al: Cell movements in a living mammalian tissue: Long-term observation of individual cells in wounded corneal endothelia of cats. J Morphol

174:25-39, 1982.

- 16) **Armstrong PB:** Time-lapse cinemicrographic studies of cell motility during morphogenesis of the embryonic yolk sac of Fundulus heteroclitus (Pisces teleosti). J Morphol 165: 13—29, 1980.
- 17) Matsuda M, Sawa M, Edelhauser HE, et al:
- Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. Invest Ophthalmol Vis Sci 26: 443—449, 1985.
- 18) **Honda H:** How much does the cell boundary contract in a monolayer cell sheet? J Theor Biol 84: 575—588, 1982.